

Fritz Lampert

Leukämie und Chromosomen

Abschiedsvorlesung am 4.5.1998, Universitäts-Kinderklinik Gießen

Sehr geehrter Herr Dekan, lieber Herr Knorpp, lieber Herr Neuhäuser, Professoren, Kommilitoninnen und Kommilitonen, meine Damen und Herren,
als erstes Dank an Sie alle, daß Sie zu dieser Vorlesung gekommen sind. Es ist ja die letzte Gelegenheit, noch einmal das Wort zu haben und an sich selbst erinnern zu können. Ich werde also hauptsächlich von mir, meiner Neugier und einigen medizinischen Abenteuern erzählen.

Vorbemerkungen

Zunächst einige Sätze nach über 40 Berufsjahren: Wie heißt's bei Lukas, Kapitel 17? „Wir haben getan, was wir zu tun schuldig waren.“ Meine Pension habe ich eigentlich redlich verdient. In den 23 Jahren in Gießen habe ich keinen einzigen Tag in der Klinik wegen Krankheit gefehlt (nur einmal eine Woche wegen angebrochenem Hüftknochen nach Fahrradunfall). Außerdem wurde von mir mehr als das Zehnfache von dem, was ich der Universität an Gehalt gekostet habe, dem Klinikum an Drittmitteln eingebracht. Unendlich dankbar bin ich, daß ich in meinem Beruf als Kinderarzt so viele Möglichkeiten der Betätigung gehabt habe, sei es am Elektronenmikroskop am Walter Reed Hospital in Washington, D.C. oder sei es als Arzt nach dem algerischen Unabhängigkeitskrieg in nordafrikanischen Berberzelten (mit Lumbalpunktion bei Kerzenlicht). Sportliche Hobbies habe ich auch einsetzen können, so seit 1983 bei der jährlichen Rennrad-TOUR PIPER für leukämiekranke Kinder durch West- und Ost-Deutschland, durch Weißbrüßland, über den Ural in Rußland,

durch die Wüsten Jordaniens und Israels. Zweimaliger Höhepunkt 1988 und 1995 war das Einradeln mit 100 Teilnehmern hinauf nach Jerusalem und Spendenübergabe am Berge Zion. Auch an weit gestreuten Auszeichnungen hat es nicht gefehlt, sei es die Ehrenmitgliedschaft der Pädiatrischen Gesellschaft von Uruguay oder die Ehrenprofessur der Medizinischen Akademie im Ural.

Bevor ich zu meiner Vorlesung komme, möchte ich aber noch an ein für diese Kinderklinik ganz besonderes Geschehnis erinnern und eine Gedenkplatte als Geschenk übergeben. Diese Tafel wird dann in der Eingangshalle unserer Kinderklinik am Treppenaufgang angebracht werden. Darauf steht:

„Beim Fliegerangriff am Abend des 6. Dezembers 1944 wurde die 1912 errichtete Kinderklinik an der Friedrichstraße völlig zerstört. Dabei fanden gemeinsam mit 16 Kindern in treuer Pflichterfüllung 16 Schwestern, Schülerinnen und eine Ärztin den Tod. Wir gedenken ihrer in Dankbarkeit.“

Nun aber zum Thema:

„Leukämie und Chromosomen oder Chromosomen und Leukämie“

Meine Forschungsaktivitäten auf diesem Gebiet umfassen einen Zeitraum von mindestens 30 Jahren und können „schwarz auf weiß“ in Sonderdrucken dokumentiert werden:

Eine vor kurzem, 1997 veröffentlichte Publikation (1) charakterisiert ein neues Leukämiegen, das AFX-Gen mit seinem Proteinprodukt. Dabei ist anzumerken: Die Sprache der Veröffentlichung ist Englisch, die

Zeitschrift ist „Oncogene“ (das heißt eine internationale mit hohem „Impact-Faktor“), neun Autoren sind vorhanden, und zwei Labors sind es, die zusammengearbeitet haben: Gießen und Wien. Dieses „Leukämie-Chromosomengeschäft“ begann aber vor 30 Jahren (5). Ich glaube, daß ich nach Avery Sandberg (14) vom Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, New York, der erste in Deutschland, Europa oder der Welt war, der routinemäßig direkt Chromosomen aus dem Knochenmark leukämiekranker Kinder präparierte. Dabei ist anzumerken: Die Sprache der Veröffentlichung ist Deutsch, die Zeitschrift ist „Virchow's Archiv“ (eine der ältesten, noch bestehenden medizinischen Zeitschriften, aber international nicht überall gelesen), und nur ein Autor ist vorhanden, der in zwei Labors gearbeitet hat: Erlangen und Gießen.



Abb. 1: Metaphase einer normalen Knochenmarkszelle des Menschen mit männlichem Karyotyp (46,XY), präpariert vom Autor 1966.

Nun wollen wir uns anschauen, was immer wieder das Auge im Mikroskop erfreut: Die Chromosomen! (Abb. 1). Diese gedrehten, wurstchenartigen Körper sind ungefähr 1–10 μ lang und können nur während der Zellteilung mikroskopisch nach beson-

derer Präparation und Färbung gesehen werden. Die Chromosomen sind die Träger des genetischen Materials und damit der Funktionen jeder Zelle im Körper. Die etwa 100 000 Gene beim Menschen sind innerhalb der Chromosomen linear hintereinander angeordnet in der DNA oder Desoxyribonukleinsäure, diesem äußerst langen „Molekül der Information“. Die Enden der Chromosomen werden als Telomer bezeichnet, und die zentrale Stelle, wo die Mitose-Spindelfasern anheften, als Zentromer. Das Zentromer teilt die Chromosomen oder die Chromatidpaare in den kurzen Arm, p, und den langen Arm, q. Der Name „Chromosom“ (griech. „Farbkörper“) wurde von dem Berliner Anatomen Wilhelm Waldeyer 1888, also vor 110 Jahren, eingeführt (19). Die Mitose, die Zell- und Kernteilung, mit Teilung der Chromosomen, wurde erstmals bei Würmern beschrieben von dem Gießener (!) Zoologen Friedrich Anton Schneider 1873 (16).

Das Geburtsjahr der modernen Human-Zytogenetik war 1956 (18), oder genauer: Es war am 22. Dezember 1955, um zwei Uhr morgens, als Jo Hin Tijo am Institut für Genetik, Lund in Schweden, im Mikroskop korrekt die diploide Zahl der Chromosomen des Menschen zählte, nämlich 46, und nicht 48, wie bisher geglaubt wurde. Er hatte kultivierte menschliche Lungenfibroblasten mit einer neuen hypotonen Technik präpariert (die von dem Chinesen T. C. Hsu in Galveston, Texas, 1952 durch Zufall entdeckt wurde (3)). Durch den Zusatz des Herbstzeitlosengifts Colchizin konnte außerdem der Mitosespindelapparat arretiert werden.

Die Chromosomenzahl ist eine feste Größe in der Natur, sie ist in allen Körperzellen eines Individuums dieselbe, sagt aber nichts aus über Höherentwicklung oder Differenzierung: Die Biene und die Taube haben zum Beispiel dieselbe Chromosomenzahl von 16, Kartoffeln und Schimpansen haben eine Chromosomenzahl von 48, die Katze 38, die

Maus 40 (Das unfruchtbare Maultier hat eine Zahl von 63, während die Eltern, das Pferd 64 und der Esel 62 aufweisen).

„Schlüsselpatient“

Mein „Schlüsselerlebnis“ über die Beziehung abnormer Chromosomen zu einem Patienten mit akuter Leukämie hatte ich vor 30 Jahren, am Abend des 21. Februars 1968. Ich war Assistent an der Universitäts-Kinderklinik Erlangen und hatte im Nachtdienst einen 14jährigen Knaben aufzunehmen mit einer besonderen Anamnese: Nach Angaben der Eltern fing der Junge mit drei Jahren an, unsicher zu gehen und undeutlich zu sprechen. Die unkontrollierten Körperbewegungen einschließlich Choreoathetose wurden

schlimmer, und mit 13 Jahren konnte er infolge dieser progressiven cerebellaren Ataxie nicht mehr ohne Hilfe stehen und gehen. Mit sechs Jahren fielen erweiterte Blutgefäße – Teleangiectasien –, besonders an den Konjunktiven und in den Ohrmuscheln, auf. Der Patient mit seiner Familie kam aus dem früheren Sudetenland der Tschechoslowakei. In diesen Dörfern war Blutsverwandtschaft häufig. Obwohl dies verneint wurde, vermutete ich es aber, da die Nachnamen der Familienmitglieder mütterlicherseits und väterlicherseits sich nur durch einen Buchstaben unterschieden. Die Familienanamnese wies etwas ganz Besonderes auf: Ein älterer Bruder des Patienten war im Alter von drei Jahren an akuter lymphoblastischer Leukämie verstorben! (Abb. 2).

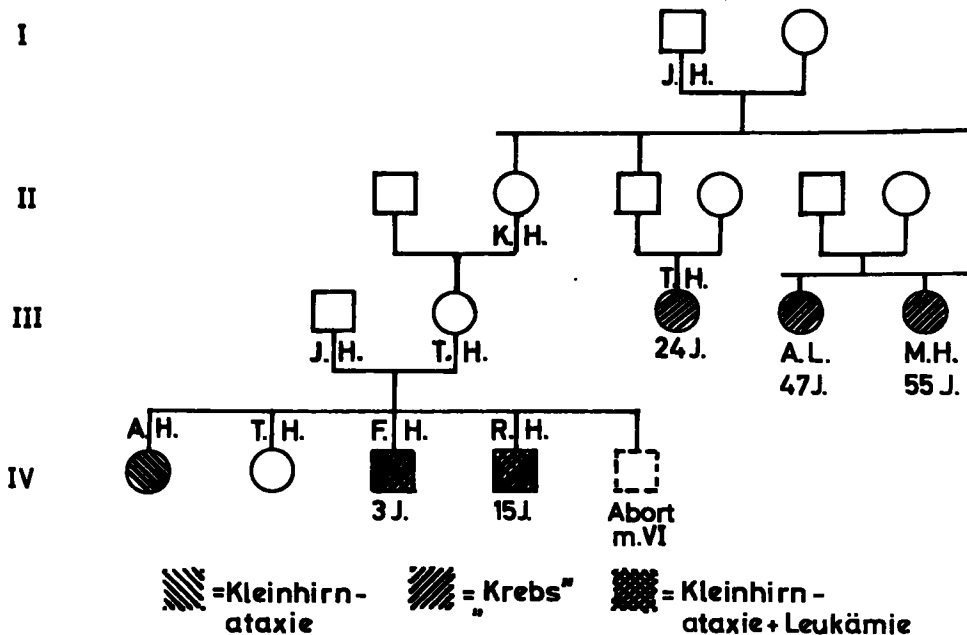


Abb. 2: Stammbaum der Familie H. mit Geschwistererkrankungen von progressiver Kleinhirnataxie AT (A.H., F.H., R.H.) und akuter lymphoblastischer Leukämie (F.H., R.H.). Drei Cousins der Mutter waren an M. Hodgkin, Mammakarzinom sowie „maligner Kollagenerkrankung“ (?) verstorben.

Der Patient selbst wurde drei Wochen vor der Krankenhausaufnahme akut krank mit Fieber, Appetitverlust, Bauchschmerzen und Durst.

Bei der körperlichen Untersuchung zeigten sich, neben den neurologischen Befunden, auch vergrößerte Leber, Milz und Lymphknoten.

Im Blut war die Leukozytenzahl mit 121 200 pro μl stark erhöht. 82 Prozent davon waren rundliche Blasten.

Um die Diagnose Akute lymphoblastische Leukämie zu sichern, machte ich eine Knochenmarkspunktion am hinteren Darmbeinkamm – diese Punktionsstelle ist hier künstlerisch an einem weiblichen Körper dargestellt. Danach wurde der Ausstrich des Knochenmarkaspirats nach *Pappenheim* gefärbt. Im Mikroskop sah man dann die dichtgedrängte uniforme leukämische Blastenpopulation, die die normale Blutzellproduktion im Knochenmark unterdrückt hatte.

Trotz der späten Nachtstunde habe ich dann direkt aus diesem Knochenmark die Chromosomen aus den sich teilenden Leukämiezellen präpariert. Die Technik war gar nicht so schwer: 0,1 Milliliter des Knochenmarkaspirats spritzte ich in zehn Milliliter einer Lösung, die halb aus Humanserum, halb aus Kulturmedium bestand und schon Colcemid enthielt. Nach 30 Minuten bei 37° konnte ich das Zellsediment abzentrifugieren und kurz, für 15 Minuten, mit hypotoner Lösung, damals noch ein Prozent Natriumzitat, versetzen, um die Mitosezellen zu schwellen. Dann wurde wieder zentrifugiert und das Sediment in Fixierlösung (Alkohol: Eisessig, 3:1) aufgerührt. Die fixierten Zellen ließ ich dann mit einer Pasteur-Pipette auf Objektträger tropfen. Nach einigen Tagen konnte ich mit Aceto-Orcein färben, um dann die Objektträger stundenlang im Mikroskop nach gutausgebreiteten Metaphasefiguren abzusuchen. Diese Metaphasen wurden dann abfotografiert, und die Chromoso-

men gezählt. Vom Foto wurden die einzelnen Chromosomen dann ausgeschnitten und nach Größe und Zentromerstellung in einem Karyogramm übersichtlich aufgeklebt.

Bei meinem Patienten konnte ich aus dem Leukämieknochenmark neun Metaphasen analysieren. Alle hatten die normale diploide Chromosomenzahl von 46, zeigten aber ein kleines, deletiertes Chromosom der G-Gruppe (Abb. 3), möglicherweise ein Chromosom Nr. 22. Zu der damaligen Zeit, vor 30 Jahren, vor der „Bänderungs-Ära“, konnte man noch nicht jedes einzelne Chromosom einwandfrei identifizieren.

Was war nun das Ungewöhnliche bei diesem Patienten? (6) (Leider starb dieser Junge, damals, vor 30 Jahren, fünf Monate nach der Diagnose an einem Rückfall, nachdem nur eine kurze Remission durch Prednison und 6-Mercaptopurin erreicht worden war.).

Chromosomenbrüchigkeit bzw. Störung der DNA-Reparatur als Ursache erhöhten Leukämieentstehungsrisikos

Wie im Stammbaum erinnerlich, waren Patient und Bruder von derselben Erbkrankheit betroffen, und beide starben an akuter lymphoblastischer Leukämie. Noch nie hatte ich eine Leukämieerkrankung bei Geschwistern in einer Familie erlebt (– die einzige Ausnahme waren eineiige Zwillinge in den ersten Monaten nach der Geburt –). Was war die Ursache für das ungewöhnlich hohe Leukämieentstehungsrisiko in dieser Familie? Es war eine seltene, autosomal-rezessiv vererbte Störung, die Ataxia Telangiectasia (AT), erstmals 1926 beschrieben und wiederholt entdeckt 1941 durch die Französin Denise Louis-Bar. Die Ataxia Telangiectasia kommt bei allen Rassen vor mit einer Häufigkeit von etwa 1 auf 40 000 bis 1 auf 100 000 Lebendgeborene. Wie bei allen seltenen Genstörungen ist die Häufigkeit aber viel größer bei Blutsverwandtschaft. Patienten mit dieser angeborenen Krankheit haben

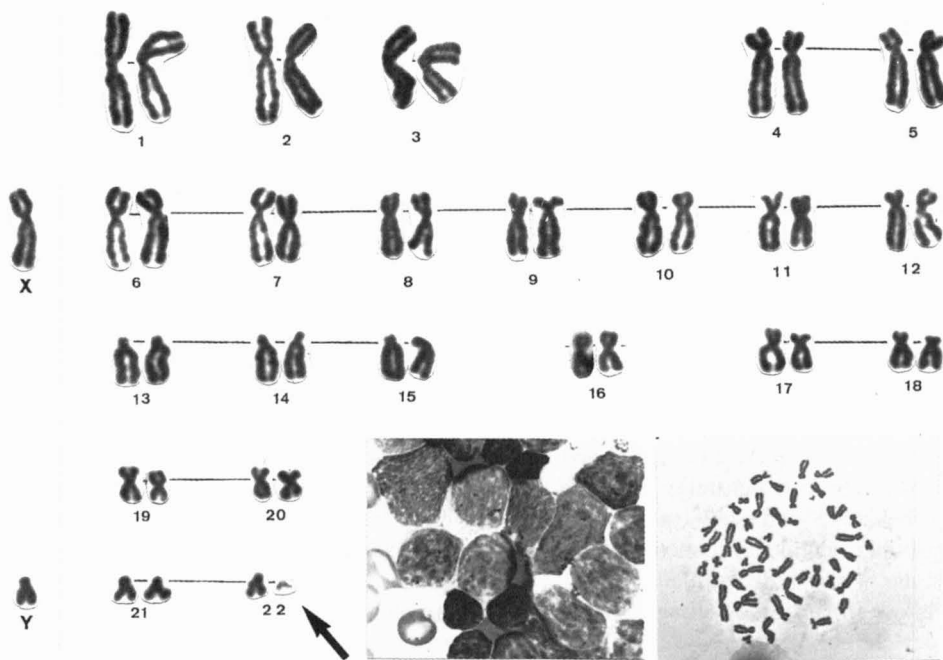


Abb.3: Metaphase, Karyogramm sowie Leukämieknochenmark des Patienten R.H.: Deletiertes Chromosom der Gruppe G (Pfeil).

eine extrem hohe Krebshäufigkeit, 100mal mehr im Vergleich zu normalen Altersgenossen (17). Zehn bis vierzig Prozent der AT-Patienten bekommen Krebs, und bei 80 Prozent davon sind es dabei die von Lymphozyten ausgehenden Krebskrankheiten. Außerdem ist AT gekennzeichnet durch Immunodefizienz, vorzeitiges Altern (auch auf zellulärem Gebiet), und, ganz besonders, durch die erhöhte spontane **Chromosomenbrüchigkeit**. Patienten mit dieser Krankheit sind homozygot für ein mutiertes Gen, das AT-Gen. Dieses sitzt auf dem Chromosomenlocus 11q23 und ist vor kurzem cloniert und sequenziert worden. Ein Prozent der Bevölkerung sind Genträger; diese Heterozygoten haben ein vierfach erhöhtes Krebs-erkrankungsrisiko. Dieses seltene AT-Gen

gilt heute als das bisher „häufigste Krebsgen“. Das normale AT Genprodukt nimmt wahrscheinlich als „caretaker“ für die Genom- bzw. Chromosomenstabilität eine Schlüsselposition im zellulären Signalübertragungssystem ein und mobilisiert zum Beispiel nach DNA-Schäden die DNA-Reparaturenzyme (4). Eine allgemeine Chromosomeninstabilität oder ein Verlust der DNA-Reparaturfähigkeit erhöhen also das Risiko für Zellgenveränderungen und damit für die Krebszellentstehung. Höchstes Risiko für Krebsentstehung ist das zunehmende Lebensalter. Durch Alterung bricht eben alles immer mehr zusammen!

Diese *Chromosomenbrüchigkeit* kann man auch bei anderen, sehr seltenen, vererbten

Chromosomenbruchsyndromen sehen, die auch mit erhöhtem Krebsrisiko einhergehen wie bei Bloom's Syndrom oder hier bei einem sechs Jahre alten Mädchen mit Fanconi-Anämie. Auch kann man Chromatidbrüche sehr leicht direkt in vitro erzeugen, wenn man zum Beispiel Zytostatika auf Lymphozytenkulturen einwirken läßt.

Das „Philadelphia-Chromosom“ mit BCR/ABL Rearrangement

Nun, zurück zum Leukämiekaryotyp unseres Patienten: Das deletierte G-Chromosom war möglicherweise ein Chromosom 22, welches am langen Arm bei q11.2 abgebrochen war. Diese Bruchstelle 22q11 ist eine ganz bekannte und stellt quasi den Ausgangspunkt der menschlichen Onkozytogenetik dar. 1960 entdeckte Peter Nowell (12) in Philadelphia dieses winzige Chromosom bei der chronischen myeloischen Leukämie (CML), aber erst 1973 konnte Janet Rowley (13) in Chicago mit Hilfe der modernen Chromosomen-Bänderungstechnik nachweisen, daß dieses „Philadelphia-Chromosom“ durch eine reziproke Translokation (Verschiebung) zwischen dem langen Arm der Chromosomen 9 und 22 entstanden war. Seit über zehn Jahren wissen wir nun, daß bei dieser Chromosomenaberration zwei Gene beteiligt sind bzw. fusionieren, c-abl und bcr, die dann ein neues Protein produzieren, welches für die neoplastischen Eigenschaften der transformierten Zelle verantwortlich ist. Dieses Philadelphia-Chromosom kann man fast in allen Fällen von CML nachweisen; es kommt aber auch in Zellen der akuten lymphoblastischen Leukämie vor, allerdings nur bei 3 Prozent im Kindesalter (verglichen mit 30 Prozent im Erwachsenenalter). Das Philadelphia-Chromosom bzw. das BCR/ABL Rearrangement kann in den Leukämiezellen nur durch Zytogenetik oder Molekulargenetik nachgewiesen werden (15). Da diese Translokation wiederum

einen ganz schlechten Prognosefaktor mit Chemotherapieresistenz darstellt, ist es ganz wichtig, schon bei Diagnose vor der Chemotherapie diesen zytogenetischen Typ festzulegen.

„Schlüsselbild“

Zurück zur Morphologie vor 30 Jahren: Mir fiel immer das besondere Aussehen der Leukämiechromosomen auf, besonders, wenn sie einem hyperdiploiden Karyotyp mit mehr als 50 Chromosomen entstammten. In Knochenmarkaspiraten von Kindern, entweder mit einer Teilremission oder einem Teilrezidiv, kann man ja gleichzeitig im selben Versuchsansatz Chromosomen von normalen wie auch von Leukämiezellen präparieren. Dabei kann man die schlanken, gut abgrenzbaren Chromosomen normaler diploider Metaphasen (wahrscheinlich von normalen Erythroblasten) deutlich von den verwaschenen, verklumpten Chromosomen aus den hyperdiploiden Leukämiemetaphasen unterscheiden (Abb. 4).

Ich dachte, wenn schon im Lichtmikroskop die Leukämiechromosomen merkwürdig aussehen, vielleicht liegt dann in einer allgemeinen Chromosomenstrukturstörung die Ursache der Leukämie? Heute weiß ich, daß diese morphologische Veränderung wahrscheinlich durch DNA-Methylierungsprozesse hervorgerufen wird und diese Metaphasen wahrscheinlich pränatal liegengeliebene, fehlerhafte Embryonalzellen sind.

Elektronenmikroskopie am Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C./U.S.A.

Ich wollte also tiefer in die Ultrastruktur der Chromosomen eindringen, und zwar durch qualitative, noch besser quantitative, Elektronenmikroskopie bei den besten Forschern in den USA: Diese waren Ernest Du Praw in Baltimore und Gunther Bahr in Washington, D.C. So ging es wieder los über den Atlan-

tik, mit Frau und vier Kindern, finanziert durch ein Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft, diesmal zum Walter Reed Hospital, übrigens meiner einzigen militärischen Verbindung. Ich erhielt also ein

offizielles Schreiben vom Adjutant General, Department of the Army, mit der Travel Order, „to proceed from the present station to the Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C., to pursue Observer Train-

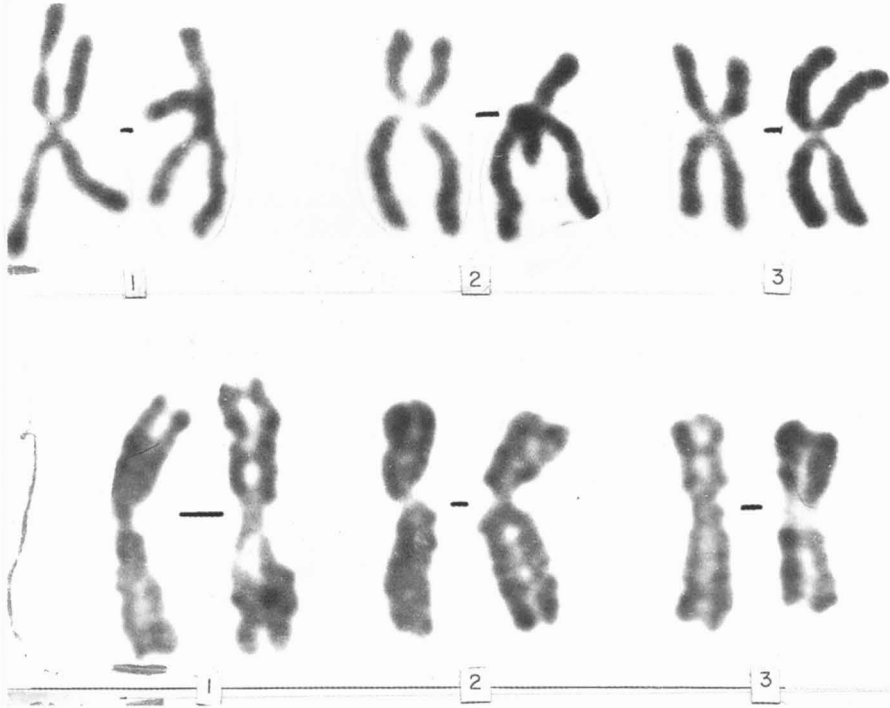


Abb.4: Partieller Karyotyp aus zwei Metaphasen derselben Aspiration mit den Chromosomen 1–3, direkt präpariert aus dem Knochenmark eines 2½ Jahre alten Knaben mit akuter lymphoblastischer Leukämie; entstammend einer Normalzelle mit 46 Chromosomen (oben) und einer Leukämiezelle mit 59 Chromosomen (unten).

ing in Electron Microscopy, reporting no later than 1 August 1968, ending 1 August 1969“. Der Brief endete mit „Training to be conducted on an UNCLASSIFIED basis“, das heißt „nicht geheim“! (Trotzdem habe ich während meines Aufenthaltes in diesem US Army Institut später unter Geheimbedingungen das damals neueste sowjetische Elektronenmikroskop in Einzelteile zerlegt!).

Burkitt-Lymphom mit Chromosomentranslokation t(8;14)

Die ersten Monate am Institut waren frustrierend; alle Experimente gingen schief, und ich ruinierte durch falsche Vakuumeinstellung fast das Siemens-Elektronenmikroskop IA. Zufällig traf ich dann die Chinesin Jacqueline Whang-Peng vom National Cancer Institute (NCI) im nahegelegenen Be-

thesda, Maryland. Sie schlug mir vor, doch die Chromosomen vom Burkitt-Tumor zu untersuchen.

1962 hatte der britische Chirurg Dennis Burkitt einen Kiefer-Hals-Tumor bei Kindern beschrieben, der auf die tropischen Regionen von Afrika beschränkt war. Die Histologie dieses Lymphoms ist typisch, einem „Sternenhimmel“ gleichend, vorgetäuscht durch die großen, hellen Makrophagen, die in die dichtgepackte Lymphoblastenpopulation eingestreut sind. Durch Zufall und Glück lernte ich am NCI den Pathologen Al Rabson kennen, der über eine Burkitt's Tumor-Zelllinie verfügte, die er 1964 aus dem Kiefertumor eines siebenjährigen nigerianischen Jungen gezüchtet hatte. Später, 1972, hatten das bulgarische Ehepaar Manulov und Manulova (11) in Biopsien von Burkitt-Tumoren ein abnormes, am langen Arm verlängertes Chromosom Nr. 14 gefunden. 1976 wurde dieses Burkitt-Tumor Marker-Chromosom durch Lore Zech in Schweden mit Hilfe der von ihr entwickelten Bänderungstechnik als Ergebnis einer reziproken Translokation zwischen Chromosom 8 und 14 herausgestellt (20). Nochmals später, in den frühen achtziger Jahren, wurde dann klar, daß in dieser für den Burkitt-Tumor typischen Chromosomentranslokation $t(8;14)$ das Protooncogen *c-myc* vom Chromosom 8 verschoben wird nach Chromosom 14 in engster Nähe zu dem Genlocus für die schweren Ketten des Immunglobulins G.

„Whole-mount“ Elektronenmikroskopie des Burkitt-Tumor Markerchromosoms

Dieses $14q^+$ Burkitt Tumor Marker-Chromosom wurde also jetzt mein Studienobjekt im Elektronenmikroskop. Ich möchte hier einmal beispielhaft im Detail beschreiben, wie man an einem Tage eine Entdeckung machen kann, die dann in elektronenmikroskopischen Abbildungen später in vielen Lehrbüchern publiziert wurde und auch einen

Wissenschaftspreis der American Medical Association bekam: Es war Dienstag, 17. September 1968: Am Abend vorher war ich am National Institute of Health in Bethesda und hatte zwei Kulturflaschen der Burkitt's Tumorzelllinie AL-1 mit wenigen Tropfen verdünnter Vinblastinlösung versetzt, um viele Zellen im Metaphasestadium der Mitose anzuhalten. Am nächsten Morgen, trotz Erkältung mit steifem Genick, fuhr ich von unserem kleinen Reihenhaushaus in Wheaton, Maryland nach Bethesda zu den NIH-Labors. Dort nahm ich die beiden flachen Zellkulturflaschen aus dem 37°C -Inkubator und steckte sie in meine Hosentasche, möglichst schenkelnah, um sie körperwarm zu halten. Dann fuhr ich mit unserem gebrechlichen, „stick-shift“ Chrysler die 50 Meilen auf dem alten Highway 29 nach Baltimore in die düstere Hafengegend, zum Department of Cell Biology, University of Maryland. Dort, im Labor, war schon Ben Lung, der chinesische pregraduate Student von Professor Ernie DuPraw, und hatte den primitiven „Kritischen-Punkt“-Trocknungsapparat mit der flüssigen Kohlendioxydbombe fertiggemacht. Nur mit Hilfe dieser besonderen „Trocknung“ durch Vermeidung von Oberflächenscherkräften kann nämlich die dreidimensionale Struktur von biologischen Präparaten gewahrt werden. Ich versetzte also meine Burkitt-Tumorzellen mit hypotonischer Ein-Prozent-Natriumcitrat-Lösung, zentrifugierte sie mehrmals in Tyrode-Lösung und spreitete dann ganz vorsichtig einen Tropfen Zellsediment auf der Wasseroberfläche eines kleinen Troges. Von dort tupfte ich die Zellen direkt mit den winzigen 200 mesh Kohle-Formvar beschichteten Kupfernetzchen für das Elektronenmikroskop ab. Die Netzchen steckte ich dann in einen Halter aus weißem Teflon, einem kleinen Wunderwerk, geschnitten mit dem Rasiermesser durch die geschickten Finger von Ben Lung. Mit „Only chinese can do that“ hatte er mir so ein Ding geschenkt, das ich

noch heute habe. Der Halter mit insgesamt 16 Netzen wurde dann dehydriert durch die steigende Alkoholreihe, kam zweimal in Amylacetat und dann in die Objektkammer des Kritischen-Punkt-Apparates, zunächst umflossen von flüssigem, später – durch Änderung der Umgebungstemperatur – gasförmigem Kohlendioxid. Mit abwechselnden Eimern von Eiswasser, danach heißem Wasser, wurde die Temperaturänderung von außen bewirkt – es gab meist eine furchtbare Wasserplanscherei.

Gleichzeitig mit diesem Experiment habe ich aus dem Zellsediment nicht nur für das Lichtmikroskop die Chromosomen präpariert, sondern mit Glutaraldehyd-Osmium habe ich auch die Zellen bzw. Chromosomen fixiert und dann in Epon 812 eingebettet für die Ultradünnschnittelektronenmikroskopie. Was war nun die Belohnung für diese wenigen, hektischen Stunden im Jahre 1968 in einem kleinen, finsternen Labor in der Innenstadt von Baltimore, wo noch vor wenigen Tagen der Aufruhr der Schwarzen durch die Straßen tobte?

Intra- und interchromosomale Fäden, Chromatinsubfibrillen

Am nächsten Tag in Washington im AFIP am Siemens-Elektronenmikroskop schon nach kurzem Suchen sah ich und „schoß“ die schönsten, gut gespreiteten und in ihrer dreidimensionalen Struktur erhaltenen Chromosomen – hier das Burkitt-Tumor-Markerchromosom (Abb. 5) – mit den geschlängelten 250 Å dünnen Chromatinfäden, die die „dicken“, im Lichtmikroskop sichtbaren Chromatidpaare bilden. Sogar die 100 Å dünne Subfibrille mit angedeuteten Nucleosomen – „wie Perlen auf einer Kette“ – wurde sichtbar (Abb. 6)

(9). Ich erinnere mich, wie ich – aus dem Fotolabor kommend – nach Entwicklung und Fixierung der EM-Glasplatten eine davon meinem Lehrer Ernie DuPraw zeigte und er

nach kurzem Lupenblick darauf ganz trocken bemerkte: „This might be the most important picture you have shot in all your life!“ Es war der erste, klare morphologische Nachweis von interchromosomalen Fäden, das heißt, daß alle Chromosomen des menschlichen Karyotyps verbunden sind, und zwar zusammenhängend durch dieselben Fäden, die auch die Chromatiden bilden (Abb. 7). Lichtmikroskopisch, bei einer Auflösung von 0,2 µ, sind diese Fäden einfach nicht erkennbar. Durch quantitative Elektronenmikroskopie konnte ich auch das Trockengewicht der einzelnen Chromosomen bestimmen, die in der Größenordnung zwischen 6 und 30×10^{-13} g liegen. Die spätere Veröffentlichung in Cancer (7) wurde ausgewählt für das Year Book of Cancer 1970 als die erste elektronenmikroskopische Darstellung eines Tumor-Markerchromosoms. Danach verbrachte ich noch viel Zeit am Elektronenmikroskop im Labor meines Bruders in San Diego, Kalifornien, um gute Aufnahmen von ultradünn geschnittenen Chromosomen zu schießen und war als EM-BO-Fellow 1971 auch in England, um meine Chromosomen auch mit X-ray diffraction (Röntgenbeugung) zu untersuchen. In einem Brief an Nature (New Biology) (8) faßte ich die Erkenntnisse über die Chromosomenultrastruktur zusammen. Ich glaube immer noch, daß mechanische Kräfte zwischen Protein und DNA innerhalb der Chromatinfäden die wichtigste Rolle bei der Suppression oder Aktivierung der Gene spielen. So endete also meine kleine Entdeckungsreise vom Patient, von der Zelle, vom Zellkern bis zum Molekül, in das Innerste der Chromosomen.

Überlebenswahrscheinlichkeit bei Kinder mit akuter lymphoblastischer Leukämie: 1990, 1970, 1960

Jetzt aber zurück zur Klinik, zur Leukämie im Kindesalter: Wo stehen wir heute, Ende



Abb. 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme (39.600 \times) eines Burkitt-Lymphom-Markerchromosoms (AL-1 Zell-Linie) nach Oberflächenspreitung und „Kritischer-Punkt-Trocknung“; Die spiralig gedrehten Chromatidarme bestehen gänzlich aus 230–250 Å im Durchmesser dünnen Chromatinfäden. Das Trockengewicht des Chromosoms lag bei $20\text{--}25 \times 10^{-13}$ g, das durchschnittliche Trockengewicht des Chromatinfadens bei 11×10^{-16} g/ μ .

der neunziger Jahre, in unserem Kampf gegen die Leukämie, mit dem Ziel, immer mehr Kinder zu heilen, besonders bei der häufigsten Form, der akuten lymphoblastischen Leukämie, der ALL?

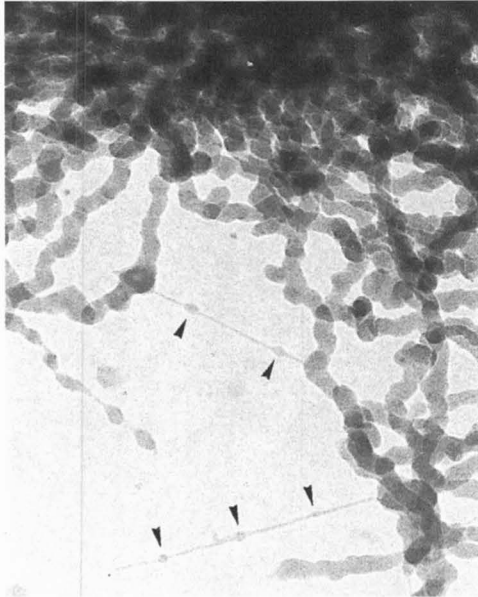


Abb.6: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Telomerregion eines ungefärbten Metaphasechromosoms einer menschlichen Tumorzellkultur nach Oberflächen-Spreitung und „Kritischer-Punkt-Trocknung“: Zwischen den typischen, vielfach geschlängelten Chromatinfäden von 230–250 Å Durchmesser sieht man gerade ausgezogene Subfibrillen, die in regelmäßigen Abständen (Pfeile) perlenartige „Aufwickelungen“ (Nucleosomen?) zeigen (105.000×).

Wie die Life-table-Analyse von über 2000 Kindern zeigt (Abb. 8), die seit 1990 mit dem ALL-BFM 90-Protokoll in vielen deutschen Zentren einheitlich zytostatisch behandelt wurden, kann die Mehrheit der Patienten sogar in fast 90 Prozent der Fälle geheilt werden. Nur eine Minderheit, die etwa elf Prozent der Kinder-ALL darstellt und durch Hochrisikofaktoren belastet ist, kann bloß in weniger als 40 Prozent der Fälle geheilt werden. Bei den Faktoren mit hohem Rückfallrisiko infolge Chemotherapieresi-

stenz, spielen die Chromosomentranslokationen t(9;22) und t(4;11) eine wichtige Rolle.

Blicken wir aber zurück auf historische life-table-Kurven bei Kindern mit ALL, so war schon vor 20 Jahren in Deutschland ein rückfallfreies Überleben bei rund 70 Prozent der Patienten möglich. Dies wurde erreicht, indem die Zeitdauer der intensiven Chemotherapieintensivphase im Anfang der Behandlung von vier auf acht Wochen verlängert wurde und mehr Zytostatika, nämlich insgesamt acht, verabreicht wurden. In den frühen siebziger Jahren konnten bereits ein Drittel der Patienten geheilt werden mit der sogenannten „Pinkel-Therapie“. Diese nach meinem Lehrer Donald Pinkel aus Memphis, USA, genannte Leukämitherapie hatte ich 1971 nach Deutschland eingeführt. Sie war charakterisiert durch eine relativ schwache, daher wenig toxische, Induktion mit Prednison und Vincristin, aber wirksame, remissionserhaltende Dauertherapie mit Mercaptopurin und Methotrexat, und, besonders zur Verhütung der ZNS-Leukämie, durch die Hirnschädelbestrahlung. Dies war die erste multizentrische Therapiestudie in Deutschland, die immerhin zu echten Heilungen bei einem Drittel der erkrankten Kinder führte (10).

Vor dieser Zeit war nur eine Lebensverlängerung möglich: Nur sporadisch wurden Zytostatika eingesetzt und meist nicht in Kombination. Bis 1960 starben ausnahmslos alle Kinder mit ALL, meist innerhalb von wenigen Monaten.

Wie im Diagramm gezeigt, besteht eine symptommachende Leukämie – (oder Krebs-)Zellpopulation aus etwa 10^{12} Zellen oder ein Kilogramm Zellmasse. Ausrotten kann man diese nur, wenn alle entarteten Zellen bis zur letzten Zelle eliminiert werden, besonders im Bereich unterhalb der lichtmikroskopischen Nachweisgrenze, und zwar durch ständigen zytotoxischen Druck – Tag für Tag!

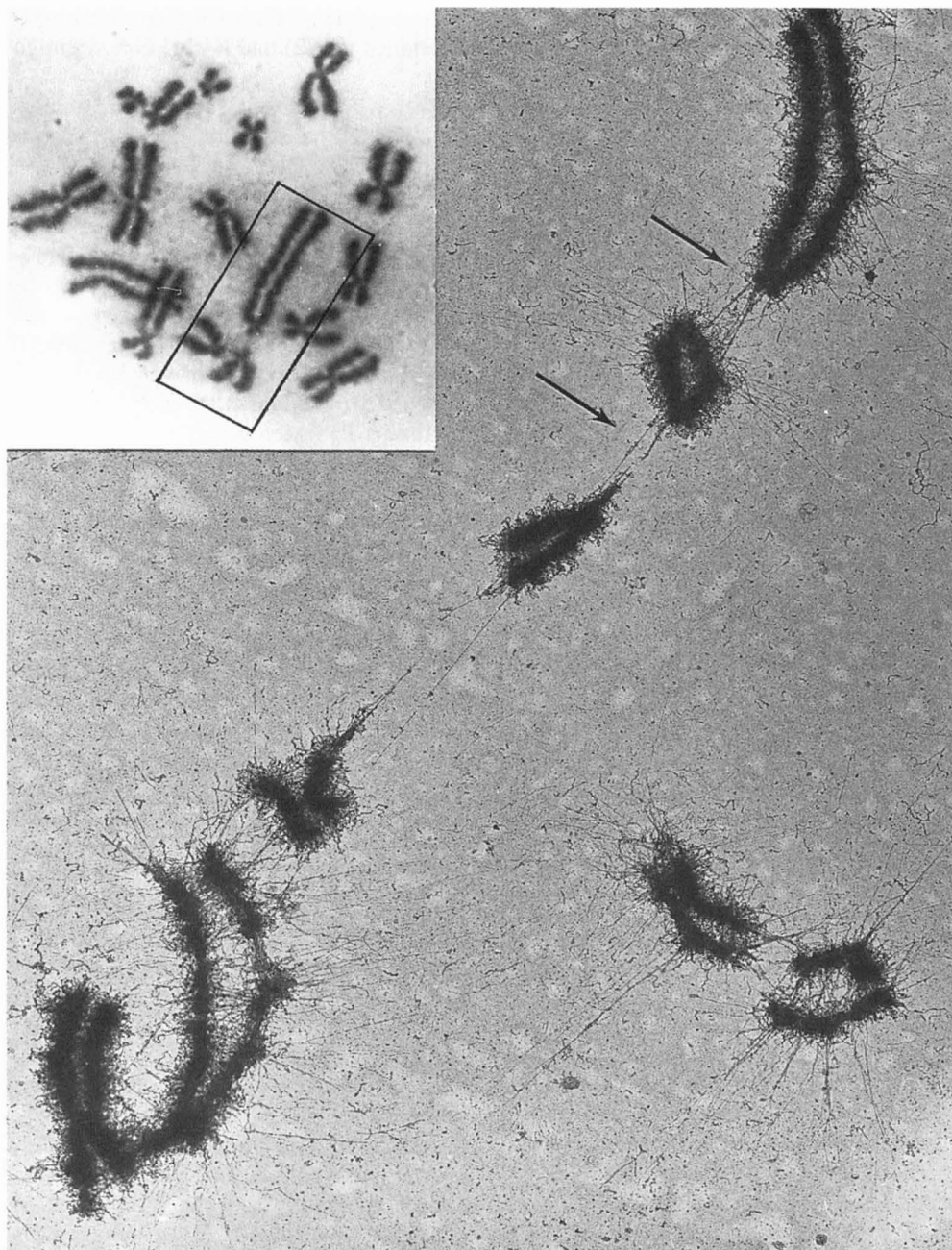


Abb. 7: Nachweis der interchromosomalen Fäden (Pfeile), die das große akrozentrische Markerchromosom der Burkitt's Tumorzelllinie AL-1 mit zwei Chromosomen der Gruppe 13–15 verbinden, sichtbar gemacht durch „whole-mount“-Elektronenmikroskopie (6.000 \times). Zum Vergleich im Ausschnitt ein partieller Karyotyp mit dem Markerchromosom derselben Tumorzellkultur in lichtmikroskopischer Mikrophotographie (1.500 \times).

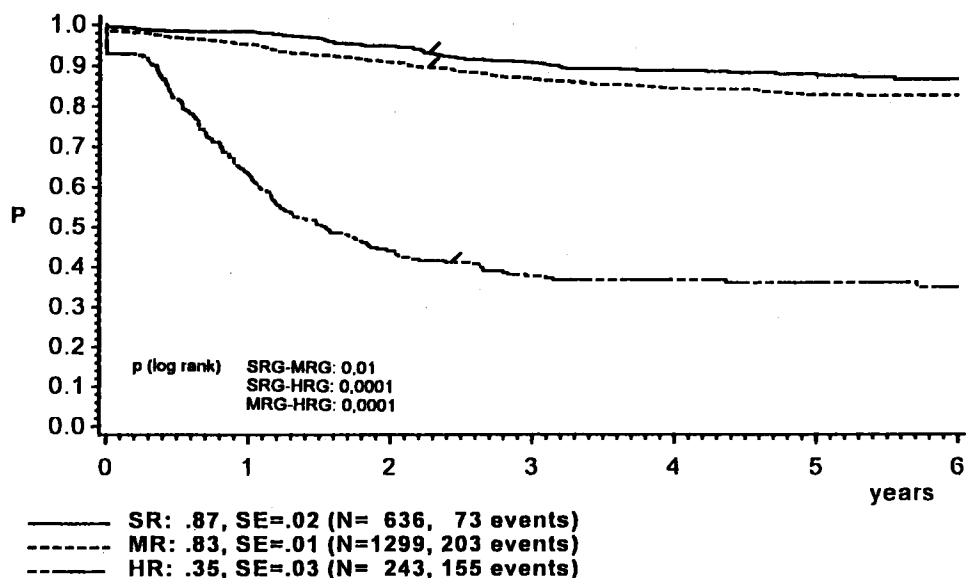


Abb.8: Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (p-EFS) von 2178 Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL), die von 1990–1995 einheitlich in Deutschland innerhalb der multizentrischen BFM-90 Therapie-studie behandelt wurden.

Leukämiechromosomenuntersuchungen zur Subtypbestimmung, Therapieanpassung und Prognose

Warum ist es so wichtig, die Chromosomenverhältnisse innerhalb der Leukämiezellpopulation schon vor der Therapie zu kennen? Nämlich, um dadurch besser, das heißt spezifischer mit der Chemotherapie auf den Genotyp der Leukämiezellen zielen und die entartete Zelle damit besser abtöten zu können!

Die Chromosomentranslokationen korrelieren mit dem Leukämiephänotyp: B-ALL ist praktisch ausschließlich durch die t(8;14)-Translokation gekennzeichnet; die T-ALL oft durch Chromosomenaberrationen, die den T-Zellrezeptor α/δ auf Chromosom 14q betreffen. Natürlich kann man bereits klinisch eine T-ALL vermuten bei einem röntgenologisch nachgewiesenen Mediastinaltumor und einer positiven sauren Phosphatasereaktion in den Blasten des Knochenmarkausstriches. Die Diagnosesiche-

rung erfolgt aber durch Immunophänotyp und Karyotyp! Die T-ALL mit Mediastinaltumor hat am dramatischsten durch die Intensivierung der Chemotherapie profitiert. Wie in den historischen Life-table-Kurven ersichtlich, stieg die Wahrscheinlichkeit für das krankheitsfreie Überleben von 13 Prozent bis auf über 50 Prozent!

Unser Ziel ist jetzt, durch ein lückenloses molekulares Screening mit der PCR (DNA-Polymerase-Ketten-Reaktion)-Methode alle wichtigen DNA-Veränderungen bei Diagnose der Leukämie zu erfassen. Von den 20 bis 30 bis jetzt bekannten Translokationen der Leukämiearten sind weniger als zehn wirklich klinisch bedeutungsvoll. Das erstaunliche dabei ist, daß es nicht nur „Badies“, also solche mit schlechter Prognose gibt, sondern auch „Goodies“, also solche mit guter Prognose. Zunächst umfaßte unser Screening-Programm, was wir hier in Gießen im 1984 etablierten Chromosomenlabor für alle deutschen Therapiestudien (ohne Kosten für den

	BCR/ABL (1/92–3/98)			MLL/AF4 (2/94–3/98)			TEL/AML1 (5/96–3/98)		
	total	pos.	%	total	pos.	%	total	pos.	%
ALL	2019	52	2.6	354	23	6.5	821	166	20.2
ALL-Rel.	371	35	9.4	41	12	29.3	146	31	21.2

	AML1/ETO (3/94–3/98)			CBFB/MYH11 (10/96–3/98)			MLL/AF9 (11/93–3/98)		
	total	pos.	%	total	pos.	%	total	pos.	%
AML	127	30	23.6	31	13	41.9	74	19	25.6
AML-Rel.	15	5	33.3	1	1		12	3	25.0

Tabelle 1: RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)-Untersuchungen auf DNA-Veränderungen in Leukämiezellen von Knochenmark und Blut bei über 3000 Kindern.

ALL = Akute lymphoblastische Leukämie; Rel. = Relaps; AML = Akute myeloische Leukämie.

BCR/ABL entspricht t(9;22); MLL/AF4 – t(4;11); TEL/AML1 – t(12;21); AML1/ETO – t(8;21); CBFB/MYH11 – inv.(16); MLL/AF9 – t(9;11).

Behandler, finanziert nur durch Spenden!) durchführen, nur das BCR/ABL-Rearrangement, die Philadelphia-Translokation. Bei positivem Nachweis ist die Konsequenz die aggressivste Therapiewahl, nämlich die Knochenmarktransplantation, wenn ein kompatibles Geschwisterkind vorhanden ist. Insgesamt haben wir jetzt über 3000 Patienten auf DNA-Veränderungen in deren Leukämiezellen untersucht (Tabelle 1).

In den letzten Jahren haben wir uns dabei auch auf eine „gute“ Translokation konzentriert, die t(12;21). In der klassischen Zytogenetik kann man diese im Lichtmikroskop aufgrund der minimalen Strukturänderung gar nicht sehen; nur durch Fluoreszenzfärbung, dem „painting“ der Chromosomen, oder durch die PCR-Methode ist sie nachweisbar. Diese t(12;21) oder TEL/AML1-Aberration kommt bei über 25 Prozent der ALL im Kindesalter vor, ist also die häufigste Leukämiechromosomentranslokation im

Kindesalter (2). Bei der ALL im Erwachsenenalter ist sie sehr selten, nur bei drei Prozent ist sie nachweisbar. Das Beste an dieser Translokation ist die Prognose. Sie ist bei dieser Leukämieart nämlich hervorragend mit Heilraten von über 90 Prozent! Die Aufgabe der Zukunft wird sein, ein noch besser wirksames, nebenwirkungsärmeres Therapieprotokoll, vielleicht mit mehr Antimetaboliten und weniger gefährlichen Anthrazyklinen und Alkylantien, bei dieser t(12;21) ALL zu erarbeiten.

Rückblick

Ich möchte nun am Schluß quasi als Vermächtnis ganz besonders neben dem Ronald-McDonald-Elternhaus die wissenschaftlichen Labors erwähnen – das Leukämiechromosomenlabor unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Jochen Harbott, das Molekulargenetiklabor unter der Leitung von

Dr. Arndt Borkhardt, das Neuroblastomlabor unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Holger Christiansen, und die über 20 hervorragenden Mitarbeiter. Der Kind-Philipp-Stiftung, die mit einer Million DM die Initialfinanzierung des Chromosomenlabors ermöglicht hat, danke ich besonders, ebenso unserem Gießener Elternverein für die fortwährende, ganz beträchtliche finanzielle Unterstützung. Hervorheben möchte ich aber noch ganz persönlich drei Frauen, die mir im klinischen Alltag durch ihre Kompetenz, Mitgefühl und Verantwortung so viel Last abgenommen haben: Frau Marlies Mourek, meiner Sekretärin seit 1975, Frau Dr. Ursula Kaufmann, der früheren Oberärztin, und Frau Dr. Dr. Renate Blüters-Sawatzki, der jetzigen Oberärztin der Abteilung.

Ich will mit zwei Bildern aufhören:

Das erste von 1984 zeigt einen gesunden vier Monate alten Säugling. Der Vater war 1971 im Alter von 14 Jahren der erste Patient mit akuter lymphoblastischer Leukämie in Gießen, der geheilt wurde, und der nun eine erfolgreiche Zahnarztpraxis hat. Heilung bei Leukämie im Kindesalter bedeutet also für das spätere Leben: normalen Beruf und normale Nachkommen!

Das letzte Bild zeigt nicht das Klonschaf Dolly, sondern wurde 1996 im Zoo von Philadelphia aufgenommen von der heute 29-jährigen Christina Zück, die vor 17 Jahren, 1981, Patientin auf der Station Piper war. Ihre im Sprengel-Museum, Hannover, ausgestellten Tierfotografien – „Wildlife Memories“ – erhielten den Deutschen Förderpreis Fotografie 1997. Mit Respekt vor dieser schöpferischen Leistung einer Patientin möchte ich meine letzte Vorlesung beenden; denn schließlich ist schöpferische Tätigkeit das höchste, was das Leben hier auf Erden zu bieten hat. Ich danke allen.

Literatur

1. Borkhardt, A., Repp, R., Haas, O.A., Leis, T., Harbott, J., Kreuder, J., Hammermann, J., Henn, T., Lampert, F.: Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23). *Oncogene* 14, 195–202 (1997)
2. Borkhardt, A., Cazzaniga, G., Viehmann, S., Valsecchi, M.G., Ludwig, W.D., Burci, L., Mangioni, S., Schrappe, M., Riehm, H., Lampert, F., Basso, G., Masera, G., Harbott, J., Biondi, A.: Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. *Blood* 90, 571–577 (1997)
3. Hsu, T.C. and Pomerat, C.M.: Mammalian chromosomes in vitro. II. A method for spreading the chromosomes of cells in tissue culture. *J. Hered.* 44, 23–29 (1953)
4. Kastan, M.: Ataxia-Telangiectasia – Broad implications for a rare disorder. *N. Engl. J. Med.* 333, 662–663 (1995)
5. Lampert, F.: Kerntrockengewicht, DNS-Gehalt und Chromosomen bei akuten Leukämien im Kindesalter. *Virchows Arch. Abt. B. Zellpath.* 1, 31–48 (1968)
6. Lampert, F.: Akute lymphoblastische Leukämie bei Geschwistern mit progressiver Kleinhirnataxie (Louis-Bar-Syndrom). *Dtsch. med. Wschr.* 94, 217–220 (1969)
7. Lampert, F., Bahr, G.F. and DuPraw, E.J.: Ultrastructure of a Burkitt's lymphoma marker chromosome, as investigated by quantitative electron microscopy. *Cancer* 24, 367–376 (1969)
8. Lampert, F.: Coiled supercoiled DNA in critical point dried and thin sectioned human chromosome fibres. *Nature New Biol.* 234, 187–188 (1971)
9. Lampert, F.: Nucleosome-DNA-coil in fibres of a human metaphase chromosome as demonstrated by whole-mount electron microscopy. *Naturwissenschaften* 65, 598 (1977)
10. Lampert, F.: Kombinations-Chemotherapie und Hirschädelbestrahlung bei 530 Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie. *Dtsch. med. Wschr.* 102, 917–921 (1977)
11. Manolov, G. and Manolova, Y.: Marker band in one chromosome 14 from Burkitt lymphomas. *Nature* 237, 33–34 (1972)
12. Nowell, P.C. and Hungerford, D.A.: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132, 1497 (1960)
13. Rowley, J.D.: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243, 290–293 (1973)
14. Sandberg, A.A., Ishihara, T., Kikuchi, Y. and Crosswhite, L.H.: Chromosomal differences among the acute leukemias. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 113, 663–716 (1964)

15. *Schlieben, S., Borkhardt, A., Reinisch, I., Ritterbach, J., Janssen, J. W. G., Ratei, R., Schrappe, M., Repp, R., Zimmermann, M., Kabisch, H., Janka-Schaub, G., Bartram, C. R., Ludwig, W. D., Riehm, H., Lampert, F., Harbott, J.*: Incidence and clinical outcome of children with BCR/ABL-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL): A prospective RT-PCR study based on 673 patients enrolled in the German pediatric multicenter therapy trials ALL-BFM-90 and CoALL-05-92. *Leukemia* 10, 957–963 (1996)
16. *Schneider, F. A.*: Untersuchungen über Plathelminthen. *Berichte der Oberhess. Ges. f. Natur u. Heilkunde*, 14, 69–140 (1873)
17. *Swift, M., Morell, D., Massey, R. B. and Chase, C. L.*: Incidence of cancer in 161 families affected by Ataxia-Telangiectasia. *N. Engl. J. Med.* 325, 1831–1836 (1991)
18. *Tjio, J. H. and Levan, A.*: The chromosome number of man. *Hereditas* 42, 1–6 (1956)
19. *Waldeyer, W.*: Über Karyokinese und ihre Beziehungen zu den Befruchtungsvorgängen. *Arch. mikrosk. Anat.* 32, 1–22 (1888)
20. *Zech, L., Hagland, U., Nilsson, K. and Klein, G.*: Characteristic chromosome abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int. J. Cancer* 17, 47–56 (1976)